

**Recovery of poly-alpha-hydroxyalkanoic acid homo- or copolymer, useful as completely biodegradable thermoplastic polymer, from biomass uses 1-methyl-2-pyrrolidone for extraction**

**Publication number:** DE19955381

**Publication date:** 2001-02-22

**Inventor:** SCHUMANN DIRK (DE); WENDLANDT KARIN-DAGMAR (DE)

**Applicant:** UFZ LEIPZIGHALLE GMBH (DE)

**Classification:**

**- international:** C08G63/89; C12P7/62; C08G63/00; C12P7/62; (IPC1-7): C12P7/62; C08G63/06; C08G63/88

**- european:** C08G63/89; C12P7/62A

**Application number:** DE19991055381 19991110

**Priority number(s):** DE19991055381 19991110

**Also published as:**



WO0134826 (A1)

[Report a data error here](#)

**Abstract of DE19955381**

Recovery of homo- or copolymers of poly- beta -hydroxyalkanoic acids (PHA) from biomass, comprising extracting the biomass with 1-methyl-2-pyrrolidone (NMP) at 80-120 deg C, separating the solution containing PHA from the resultant viscous suspension at 40 deg C or over and precipitating the PHA, is new. An Independent claim is also included for the use of NMP as an extractant for homo- or copolymers of a PHA.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide



21 Aktenzeichen: 199 55 381.5-42  
22 Anmeldetag: 10. 11. 1999  
43 Offenlegungstag: –  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 22. 2. 2001

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:  
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle  
GmbH, 04318 Leipzig, DE  
  
74 Vertreter:  
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10117  
Berlin

72 Erfinder:  
Schumann, Dirk, 04425 Taucha, DE; Wendlandt,  
Karin-Dagmar, Dr., 04105 Leipzig, DE  
  
66 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
DE 38 23 754 A1  
WO 98 46 782 A1  
WO 97 07 230 A1  
Plaste and Kautschuk, Bd. 37 (1990), S. 109-115;

64 Verfahren zur Gewinnung eines Homo- oder Copolymers einer Poly- $\beta$ -hydroxyalkansäure (PHA) aus Biomasse

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung eines Homo- oder Copolymers einer Poly- $\beta$ -hydroxyalkansäure (PHA) aus Biomasse, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Biomasse mit 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) ggf. unter Zusatz eines wasserbindenden Mittels extrahiert wird, aus der entstehenden viskosen Suspension bei Temperaturen L 40 C die PHA-enhaltende Lösung abgetrennt und anschließend die PHA ausgefällt wird.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein alternatives Verfahren zur Gewinnung eines Homo- oder Copolymers einer Poly- $\beta$ -hydroxyalkansäure (PHA) aus Biomasse, bei dem 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) als Extraktionsmittel, ggf. in Kombination mit einem wasserbindenden Mittel, eingesetzt wird.

Für die mikrobielle Herstellung einer PHA, deren bekanntester Vertreter die Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure (PHB) ist, bzw. für die Herstellung von PHA-Copolymeren werden eine Reihe von Verfahren vorgeschlagen, die in zahlreichen Dokumenten des Standes der Technik beschrieben sind. PHB und andere PHA gewinnen als biologisch voll abbaubare Polymere mit thermoplastischen Eigenschaften zunehmend wirtschaftliche Bedeutung. So ist ein Beispiel für die mikrobielle Produktion von PHB aus Methanol in EP 0 015 669 A2 angegeben, Beispiele für die Gewinnung von Copolymeren sind in EP 0 304 293 A2 und in EP 0 069 497 A2 dargestellt, wobei beispielsweise Glucose/Propionsäure als Substratgemische eingesetzt werden.

Ein Verfahren zur Gewinnung von PHB mit einem guten Ertragskoeffizienten und Saccharose als Substrat ist EP 0 149 744 A1 zu entnehmen. Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von PHB und deren Copolymeren beschreibt auch DE 196 19 084 C2.

Die Aufarbeitung von gewonnener PHA-haltiger Biomasse erfolgt üblicherweise mit oder ohne mechanischem Zellaufschluß – je nach dessen Effizienz – und anschließender Gefrier- bzw. Sprühtrocknung. Aus der getrockneten Biomasse werden die PHA-Homo- bzw. Copolymere mit einem geeigneten Extraktionsmittel gewonnen.

Aus dem Stand der Technik bekannte Extraktionsverfahren z. B. für PHB ohne vorherigen Zellaufschluß haben den Nachteil, daß die entsprechenden Ausbeuten oft gering sind (Babel W. et al., 1990, Plaste und Kautschuk 37, 109–115).

Vielfach Verwendung zur Extraktion finden halogenierte Lösungsmittel. Darunter gibt es solche, die relativ viel PHA zu lösen vermögen (wie z. B. Chloroform) und solche, aus denen sehr reine PHA gewonnen werden kann, da sich in der Lösung nur geringe Mengen an anderen Zellbestandteilen lösen (wie z. B. Dichlorethan). So beschreibt beispielsweise EP 0 015 669 A2 verschiedene Methoden zur Zellerstörung und eine daran sich anschließende PHB-Extraktion aus den zerstörten Zellen durch halogenierte Kohlenwasserstoffe wie beispielsweise Chloroform, Dichlormethan, 1,2-Dichlorethan und 1,2-Dichlorpropan.

Da die halogenierten PHA-Lösungsmittel durchweg im Verdacht stehen, starke gesundheitsschädigende Wirkungen zu haben, sind auch Verfahren zur Extraktion von PHA unter Anwendung halogenfreier Lösungsmittel bekannt. So beschreibt DE 27 01 278 A1 die Verwendung cyclischer Kohlensäureester als Lösungsmittel zur PHB-Extraktion. Die damit erzielten Extraktionsausbeuten sind jedoch gering. Desweiteren wird die Molmasse der PHB durch die hohen Extraktionstemperaturen von vorzugsweise über 120°C deutlich herabgesetzt. Als weitere bekannte Lösungsmittel fungieren Ethyl- bzw. Methylactat (DE 195 33 459 C1 und DE 196 23 778 A1). Da auch hier die Extraktionstemperaturen sehr hoch sind (z. B. 154°C bei Verwendung von Ethylactat), ist mit diesen Verfahren ebenfalls die Gefahr eines Molmasseabbaus gegeben, besonders bei vorhandener Restfeuchte der Biomasse oder des Lösungsmittels. In DE 197 12 702 A1 ist der Einsatz von Essigsäure und in DD 229 428 A1 die Verwendung von Essigsäureanhydrid als Lösungsmittel beschrieben. Essigsäure- und Essigsäureanhydrid-Extraktionen haben jedoch den Nachteil, daß die PHB-Lösungen schon bei ca. 70°C gelieren und relativ stark mit Begleitsubstanzen der Biomasse kontaminiert sind. Zu-

dem verbleibt ein gewisser Teil der Lösungsmittel in der PHB, so daß die erhaltene PHB nicht geruchsfrei ist. Ein späterer Molmasseabbau durch saure Hydrolyse ist ebenfalls nicht auszuschließen.

WO 9846782 A1 beschreibt eine ganze Reihe von Lösungsmitteln zur Gewinnung von Polyhydroxyalkanoaten (PHA). Die meisten der dort dargestellten Lösungsmittel besitzen selbst bei hohen Temperaturen über 100°C nur geringe Lösungseigenschaften und werden hauptsächlich zur Gewinnung von PHA-Copolymeren eingesetzt. Da PHA-Copolymere im allgemeinen besser löslich sind als hochmolekulares Homopolymer, können die angegebenen Lösungsmittel nicht oder nur äußerst beschränkt für Homopolymere eingesetzt werden.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, ein Verfahren zur PHA-Homo- und Copolymeren-Gewinnung aus Bakterienbiomasse bereitzustellen, das einfach und zuverlässig zu handhaben ist und bei dem die gesundheitliche Belastung für den Verarbeiter geringer ist als mit chlorierten Kohlenwasserstoffen. Dabei sollen die Qualität und die Ausbeute an PHA-Homo- oder Copolymer vergleichbar sein.

Es wurde nun gefunden, daß 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) besonders vorteilhaft zur Extraktion eines Homo- oder Copolymers einer PHA aus Biomasse eingesetzt werden kann und darüber hinaus auch hervorragend zur Umfällung einer PHA bzw. dessen Copolymer verwendbar ist. Als Biomasse ist die Gesamtheit allen organischen Materials anzusehen, das durch Wachstum und Stoffwechsel von Tieren, Pflanzen oder Mikroorganismen gebildet oder auch z. B. gentechnisch hergestellt wird. Besonders bevorzugt ist NMP zur PHB-Extraktion geeignet, wobei die Ausbeuten an PHB ohne vorherigen mechanischen oder enzymatischen Aufschluß der Zellen mindestens ähnlich hoch liegen wie bei bekannten PHB-Extraktionsmitteln.

Gemäß dem Verfahren der Erfindung wird Biomasse mit NMP extrahiert. Aus der entstehenden viskosen Suspension wird bei Temperaturen  $\geq 40^\circ\text{C}$  die PHA-Homo- oder Copolymer-enthaltende Lösung abgetrennt und anschließend werden entweder PHA-Homopolymere oder -Copolymere ausgefällt. Insbesondere für PHB hat sich gezeigt, daß das NMP die PHB ebenso gut löst wie Chloroform und mit seinem Lösevermögen von mindestens 13,8 Masseprozent bei 100°C deutlich über dem bekannter PHB-Löser liegt.

Das gilt auch für andere PHA, so z. B. für Homopolymere der  $\beta$ -Hydroxypropionsäure, der  $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure,  $\beta$ -Hydroxyhexansäure, der  $\beta$ -Hydroxyoctansäure, der  $\beta$ -Hydroxydodekansäure bzw. für die PHA-Copolymere wie z. B. aus PHB und  $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante der Erfindung werden zur Extraktion neben NMP wasserbindende Substanzen, wie z. B. Essigsäureanhydrid, zugegeben. Dadurch wird eine eventuelle Hydrolyse, die eine Abnahme der mittleren Molmasse des Polymers zur Folge hätte, vermieden. In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung wird ein bestimmter Anteil des wasserbindenden Mittels zur gezielten Einstellung einer mittleren Molmasse des Polymers entsprechend seinem vorgesehenen Anwendungszweck eingesetzt, d. h. je nach Wassergehalt des Extraktionsmittels NMP, der über das wasserbindende Mittel gesteuert wird, kann die gewünschte mittlere Molmasse der PHA eingestellt werden.

Die Extraktion erfolgt erfindungsgemäß bei 80–120°C, vorzugsweise bei 85–115°C, besonders bevorzugt bei ca. 100°C. Die Extraktionszeit sollte kurz gehalten werden und beträgt ca. 10 bis 20 Minuten.

Da die NMP-PHA-Lösung erst beim Unterschreiten von ca. 35–40°C (in Abhängigkeit von der Molmasse der PHA und der Konzentration der Lösung) geliert, kann aus der vis-

kosen Suspension bei Temperaturen  $\geq 40^\circ\text{C}$  die PHA-Lösung abgetrennt werden. Dies kann in einfacher Weise durch Filtration oder Zentrifugation erfolgen oder auch mit einem beheizbaren Separator. Im Vergleich mit anderen Extraktionsmitteln zeichnet sich die mit NMP durchfeuchtete, sedimentierte Biomasse durch eine besondere Festigkeit aus, so daß die Gefahr der Aufschlämmung des Sediments beim Abtrennen der PHA-Lösung durch Dekantieren sehr gering ist.

Zum Ausfällen der PHA-Homo- oder Copolymeren wird bevorzugt Wasser eingesetzt, aber auch organische Lösungsmittel wie z. B. Methanol, Aceton oder Ester wie z. B. Methylacetat, Ethylacetat u. a. bzw. deren Mischungen mit Wasser, in denen PHA unlöslich ist, sind zum Fällern geeignet. Methanol, Aceton und ähnliche Fällungsmittel mit einem relativ niedrigen Siedepunkt haben den Vorteil daß sie eine Rückgewinnung sowohl des Lösungsmittels als auch des Fällungsmittels ermöglichen. Bedingt durch den relativ hohen Siedepunkt des NMPs von  $202^\circ\text{C}$  kann ein Fällungsmittel (wie z. B. Methanol) mit einem niedrigen Siedepunkt nach der Abtrennung der ausgefallenen PHA leicht vom NMP durch Destillation (Vakuum) abgetrennt werden. In Gegensatz dazu ist die Rückgewinnung der nach dem Stand der Technik verwendeten PHA-Lösungsmittel, wie z. B. Chloroform (Sdp.  $61^\circ\text{C}$ ) mit Methanol als Fällungsmittel (Sdp.  $65^\circ\text{C}$ ) kaum realisierbar, da deren Siedepunkte relativ nahe beieinander liegen und teilweise azeotrope Gemische erhalten werden.

Insbesondere für PHB wird beim Ausfällen in Wasser optisch fast reinweiße PHB erhalten. Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte PHB weist geringe Stickstoffgehalte um 0,5% auf, die zum einen von NMP-Resten, zum anderen durch Proteine aus der Biomasse verursacht sein können. Damit ist die Qualität der erfindungsgemäß hergestellten PHB mit der von Essigsäure- oder Chloroform-extrahierter PHB vergleichbar.

Mit dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren können – abhängig von der Art der Biomasse – ca. 80% der vorhandenen PHA bzw. deren Copolymere gewonnen werden. Soll die Ausbeute weiter erhöht werden, so können die bei der Zentrifugation anfallenden Feststoffpartikel gesammelt und nachextrahiert werden. NMP-Reste und andere Verunreinigungen lassen sich durch eine Nachextraktion mit geeigneten Lösungsmitteln, wie Methanol, leicht entfernen. So ist z. B. eine nachextrahierte PHB, gaschromatographisch bestimmt, ca. 99,5–100%ig.

Da NMP ein stark polares Lösungsmittel ist, werden bei der Biomasse-Extraktion nicht nur Homo- und Copolymere der PHA, sondern auch viele andere Zellbestandteile gelöst. Im Unterschied zu einer Essigsäure-Extraktion kontaminieren diese jedoch die PHA bei der Fällung in Wasser nahezu nicht, sondern bleiben in Lösung. Zur Vermeidung bzw. zur Verminderung der im NMP gelösten Anteile anderer Zellbestandteile wird ggf. eine Vorextraktion mit entsprechenden Lösungsmitteln oder enzymatisch durchgeführt.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) als Extraktionsmittel für Homo- oder Copolymere einer Hydroxyalkansäure. So wird NMP zur Gewinnung von PHA-Homo- und Copolymeren aus einer die Polymere enthaltenden Biomasse, insbesondere aus dem Zellmaterial eines Mikroorganismus, gentechnisch veränderter Pflanzen oder PHA-haltiger Hefen eingesetzt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann NMP auch dazu verwendet werden, eine mit hochkonzentrierter PHA angereicherte Biotrockenmasse oder ein Verunreinigungen enthaltendes PHA-Homopolymer oder PHA-Copolymer zur Nachreinigung umzufällen. Vorzugsweise betrifft die Erfindung die Verwendung von NMP zur Extraktion von

PHB.

Die gesundheitliche Belastung ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren mit NMP auf jeden Fall weitaus geringer als mit chlorierten Kohlenwasserstoffen als Extraktionsmittel, die nachgewiesenermaßen Leberschäden oder sogar Krebs hervorrufen. Obwohl NMP haut- und augenreizend ist, ist es nicht ätzend, giftig oder gar krebserzeugend. Darüber hinaus ist NMP besser biologisch abbaubar. Auch ist NMP vorteilhafter zu handhaben, da es nicht leicht entzündlich ist. Im Vergleich zu den halogenierten Lösungsmitteln ist NMP wesentlich weniger flüchtig, was sich beim Umgang und bei der Lagerung durch deutlich weniger Verluste bemerkbar macht (der Siedepunkt von NMP liegt, wie bereits erwähnt, bei  $202^\circ\text{C}$ , während der von Chloroform beispielsweise bei  $61,7^\circ\text{C}$  liegt).

Nachfolgend soll die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels näher beschrieben werden, ohne sie darauf einzuschränken:

#### Ausführungsbeispiel

Methylocystis spec. GB 25 wurde als PHB-Produzent eingesetzt und auf bekannte Art kultiviert. Für die gefriertrocknete Biomasse wurde gaschromatographisch ein PHB-Gehalt von durchschnittlich 45% (bezogen auf Trockenmasse) ermittelt. Als durchschnittliche Molmasse wurde viskosimetrisch ein Wert von 1100000 g/mol bestimmt. Das Lösungsmittel-Biotrockenmasse-Verhältnis lag bei 1:10. Zuerst wurde das Lösungsmittel NMP auf  $85^\circ\text{C}$  aufgeheizt und dann mit der Biotrockenmasse versetzt. Zusätzlich wurden 2 ml Essigsäureanhydrid pro 100 ml NMP und 10 g Biotrockenmasse mit einem gesamten Restfeuchte-Gehalt von 3,6 g zugegeben um die Hydrolyse-Gefahr der PHB durch Restfeuchte zu vermindern. Die Temperatur wurde während der Extraktionszeit von 15 Minuten bis auf  $100^\circ\text{C}$  erhöht und bei diesem Wert gehalten. Anschließend wurde die Biomasse von der Lösung durch Zentrifugation bei ca. 20000 xg abgetrennt. Das Biomasse-Pellet wurde verworfen. Der klare, leicht gelbliche Überstand wurde durch eine Düse in demineralisiertes Wasser eingeleitet und somit die PHB ausgefällt. Das ausgefällte Polymer wurde abgesiebt, durch Pressen von anhaftender Lösung weitgehend befreit, gewaschen, getrocknet und schließlich mit Methanol nachextrahiert. Das so gewonnene reinweiße Polyhydroxybutyrat hatte gaschromatographisch bestimmt eine Reinheit von 99,5% und eine Molmasse von 780000 g/mol.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von Homo- oder Copolymeren von Poly- $\beta$ -hydroxyalkansäuren (PHA) aus Biomasse, dadurch gekennzeichnet, daß die Biomasse mit 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) bei  $80$ – $120^\circ\text{C}$  extrahiert wird, aus der entstehenden viskosen Suspension bei Temperaturen  $\geq 40^\circ\text{C}$  die PHA-enthaltende Lösung abgetrennt wird und die PHA ausgefällt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Extraktion zusätzlich ein wasserbindendes Mittel, vorzugsweise Essigsäureanhydrid, zugegeben wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Extraktion bei  $85$ – $115^\circ\text{C}$  durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung der PHA-enthaltenden Lösung mittels Filtration, Zentrifugation oder mittels eines beheizbaren Separators erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausfällung der PHA in Wasser oder organischen Lösungsmitteln, in denen PHA unlöslich ist, erfolgt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausfällung der PHA in Methanol, Aceton oder in Estern oder in deren Mischungen mit Wasser erfolgt.

7. Verwendung von 1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) als Extraktionsmittel für Homo- oder Copolymere einer Poly- $\beta$ -hydroxyalkansäure.

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß NMP zur Extraktion von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure (PHB) oder deren Copolymeren verwendet wird.

9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß NMP in Kombination mit einem wasserbindenden Mittel verwendet wird.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß NMP in Kombination mit einem wasserbindenden Mittel zur gezielten Einstellung der mittleren Molmasse des Polymers verwendet wird.

25

30

35

40

45

50

55

60

65